

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 642 767

(21) N° d'enregistrement national :

89 00599

(51) Int Cl⁸ : C 12 N 15/67, 15/86.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19 janvier 1989.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 32 du 10 août 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rantes :

(71) Demandeur(s) : *TRANSGENE S.A. Société anonyme.* —
FR.

(72) Inventeur(s) : Henri de La Salle; Thérèse Faure.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf,
Warcoin et Ahner.

(54) Vecteurs d'expression de protéines hétérologues dans les cellules eucaryotes, lignées cellulaires obtenues et
procédé pour leur préparation.

(57) La présente invention concerne un vecteur d'expression
d'une protéine hétérologue dans les cellules eucaryotes com-
prenant une séquence d'ADN codant pour la protéine hétéro-
logue ainsi que les éléments assurant son expression, caracté-
risé en ce que les éléments assurant l'expression de la sé-
quence codant pour la protéine hétérologue comprenant les
éléments essentiels de la séquence leader et/ou de la sé-
quence du promoteur du gène E-1 de l'Adénovirus 2.

FR 2 642 767 - A1

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

Docket No. 293102003000
U.S. Serial No. 09/871,212

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs d'expression de protéines hétérologues dans des cellules eucaryotes, en particulier des cellules de mammifères.

5

Par protéine hétérologue, au sens de l'invention, on entend une protéine qui n'est pas exprimée naturellement par les cellules en cause, ou encore une protéine qui n'est pas nécessaire à la survie de ces cellules.

10

De nombreux vecteurs faisant exprimer des gènes codant pour de telles protéines hétérologues dans des cellules de mammifères ont déjà été décrits. Le besoin de disposer de vecteurs de plus en plus performants est permanent, notamment pour augmenter de façon sensible la quantité de produit synthétisé par le système hôte et permettre la sélection des cellules productrices et la préparation de lignées cellulaires stables produisant ladite protéine en des quantités compatibles avec un rendement industriel. Différentes approches ont déjà été suggérées pour améliorer l'efficacité de ce type de vecteurs au niveau de la transcription comme au niveau de la traduction.

15

20

25

Ainsi par exemple de nombreux vecteurs utilisent en tant que promoteur de la transcription de la séquence d'ADN codant pour la protéine hétérologue, des séquences hybrides comprenant les séquences activatrices du virus SV40 (répétitions de 72 paires de bases) associées au promoteur majeur tardif de l'Adénovirus 2. Une amélioration de l'efficacité de ce type de vecteur a déjà été obtenue par différents moyens, en insérant des séquences d'ADN supplémentaires originaires de SV40 (répétitions de 21 paires de bases) et capables de lier

30

35

des facteurs de transcription ou encore des séquences du leader tripartite de l'Adénovirus 2 favorisant la traduction de l'ARN messager.

5 La présente invention vise à fournir de nouveaux vecteurs, utiles notamment pour l'expression de protéines complexes tels que les facteurs de coagulation, dans les cellules de mammifères.

10 Les vecteurs selon l'invention sont caractérisés en ce que les éléments assurant l'expression de la séquence codant pour la protéine hétérologue comprennent les éléments essentiels de la séquence leader et/ou de la séquence du promoteur du gène EIII de l'Adénovirus 2.
15 Par élément essentiel on entend la séquence assurant l'augmentation de la production de protéine et/ou le contrôle de l'expression de la séquence pour le promoteur.

20 Les adénovirus possèdent un ADN linéaire double brin qui dans le cas du sérotype 2 (Ad2) compte 35 kilobases. Les adénovirus ont cinq unités de transcription précoces ou plus dont celle du gène EIII et plusieurs unités de transcription tardives (1,2). La
25 carte de restriction des éléments amont du gène EIII est représentée sur la figure 1. Les coordonnées indiquées pour les nucléotides correspondent à celles obtenues à partir de la séquence Ad2 de la banque de donnée EMBL.

30 Parmi les éléments importants du gène EIII, on distingue le promoteur et la séquence leader, le promoteur allant jusqu'au site Cap, et la séquence leader allant depuis le site Cap jusqu'à l'ATG initiateur de la traduction.

Différentes variantes de l'invention peuvent être réalisées.

Dans une première variante, seule tout ou partie de la séquence leader du gène EIII, est présente sur le vecteur. De préférence, il s'agit d'une partie de la séquence qui comporte un intron, de sorte que le vecteur d'expression porte un intron dans la partie 5' non traduite de l'ARN messager (voir figure 1). Dans ce cas, on peut utiliser comme promoteur, tous les promoteurs fonctionnels pour exprimer des gènes hétérologues dans les cellules de mammifères. On peut citer par exemple celui du cytomégalo virus ou celui du gène de la métallothionine.

Dans une seconde variante, le vecteur selon l'invention comprend tout ou partie du promoteur du gène EIII, c'est-à-dire la partie 5' des éléments de transcription allant jusqu'au site Cap.

Une variante préférée est celle où le vecteur comprend à la fois la partie de la séquence leader qui porte un intron et tout ou partie du promoteur du gène EIII de l'Adénovirus 2.

Il est bien sûr préférable d'avoir à la fois la séquence leader et le promoteur correspondant au même gène de l'Adénovirus 2. Il est avantageux, suivant une caractéristique supplémentaire de l'invention, d'ajouter un activateur de transcription, en particulier les séquences activatrices de SV40 (par exemple les répétitions de 72 paires de bases, ou encore celle de 21 paires de bases ou une association des deux).

Les vecteurs selon l'invention sont en général des plasmides mais on peut également envisager des vecteurs viraux dans la mesure où il s'agit de virus dont le cycle comprend une étape dans laquelle le génome est sous forme d'ADN double brin comme par exemple les papillomavirus. Ils sont de préférence construits pour assurer l'intégration de la séquence codant pour la protéine hétérologue dans le génome de la souche hôte, de façon à obtenir des lignées cellulaires stables produisant ladite protéine. Afin d'obtenir des cellules comportant un grand nombre de copies du gène codant pour la protéine hétérologue, les vecteurs d'intégration peuvent comporter une séquence assurant l'intégration du vecteur en plusieurs centaines de copies comme par exemple le fragment d'ADN mitochondrial murin du plasmide p delta.

Dans certains cas, il peut être intéressant, pour augmenter la production de la protéine hétérologue, que le vecteur comporte une séquence d'ADN supplémentaire, en aval de la séquence d'ADN codant pour ladite protéine hétérologue.

Pour sélectionner les cellules transformées, le vecteur comporte de préférence un gène de sélection, par exemple le gène codant pour la xanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (résistance à l'acide mycophénolique, XGPRT), le gène de résistance à la G418 (Néo), ou encore le gène dihydrofolate réductase (DHFR) qui confère la résistance au méthotrexate. On utilisera de préférence le gène Néo.

Le gène de sélection peut être porté par une unité de transcription indépendante, ou encore être placé directement en aval de la séquence d'ADN codant

pour la protéine hétérologue. Ce deuxième cas est particulièrement avantageux, puisqu'il permet d'obtenir un double effet : augmentation de la production et amélioration de l'efficacité de sélection.

5

Il peut aussi être avantageux de placer le gène de sélection dans un bloc d'expression polycistronique contenant un promoteur, une séquence d'ADN codant pour la protéine hétérologue, un gène de sélection, un intron, un site de polyadénylation. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que les ribosomes peuvent réinitier la traduction en aval du codon stop, et cette propriété est utilisée pour construire des plasmides contenant un bloc de sélection polycistronique. Comme gène de sélection, on peut employer ceux qui ont été cités plus haut, le gène de souris codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR) et le gène bactérien de XGPRT.

10

15

20

25

Afin de pouvoir sélectionner plus facilement, après transformation des cellules de mammifères, celles qui expriment la protéine hétérologue en quantité, il est particulièrement avantageux d'ajouter à une unité polycistronique une unité de transcription d'un gène de sélection. De préférence, on utilisera un bloc d'expression du gène DHFR, par exemple sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 privé de sa séquence activatrice.

30

L'invention a également pour objet un procédé de préparation de cellules eucaryotes, afin d'obtenir des lignées cellulaires produisant une protéine hétérologue selon lequel on effectue la transformation de ces cellules par un vecteur selon l'invention et on sélectionne les cellules exprimant lesdites protéines.

Parmi les méthodes de transformation utilisées, on peut citer en particulier la technique de coprécipitation au phosphate de calcium, qui sera mise en oeuvre dans les exemples ci-après.

5

Enfin, l'invention a pour objet les lignées cellulaires obtenues par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, en particulier des lignées CHO produisant du Facteur VIII ou du Facteur IX. En effet, l'invention est applicable à la préparation des facteurs de la coagulation sanguine et concerne donc également un procédé pour leur préparation, selon lequel on cultive les cellules sur un milieu de culture approprié et on récupère la protéine obtenue à partir de la culture.

15

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée suivante. Celle-ci indique quelques exemples de constructions selon l'invention et leur application à l'expression de protéines complexes dans des cellules de mammifères.

20

Les figures suivantes illustrent l'invention :

25

- La figure 1 schématise la carte de restriction des éléments de transcription amont du gène EIII.

- La figure 2 représente schématiquement la structure du plasmide pSB394.

30

- La figure 3 représente schématiquement la structure du plasmide pSBDH394.

35

- La figure 4 représente schématiquement la structure des plasmides pTGEIII385, pTGEIIIDH385, pTGEIIINéo385.

- La figure 5 représente schématiquement la structure du plasmide pTG2307.

- La figure 6 représente schématiquement la structure du plasmide pTG2330.

Exemple 1 Expression transitoire de facteur IX dans des cellules CHO

a) Construction de pSB394 et pSBDH394

Le plasmide pSB394 (fig. 2) est un vecteur dérivé de pTG157 décrit dans la publication européenne de brevet EP.A.0140762 où les séquences EcoRI - BglII codant pour la glycoprotéine rabique ont été éliminées et remplacées par les fragments suivants :

- le fragment EcoRI - KpnI du polylinker de M13TG131 (3)
- l'activateur entier du virus SV40 sous forme du fragment KpnI - HindII de pS0 (4) ;
- une partie de la séquence du promoteur majeur tardif de l'Adénovirus 2, SmaI - BamHI de pM4 (5) ;
- le fragment BamHI - BglII du polylinker de M13TG127, vecteur comprenant un polylinker de séquence
5' AGATCTGCAGGTCCAAGCTTGGACGGATCCCCGGGG...ETC 3'
comportant des sites de restriction BglII, PstI, HindIII, BamHI, SmaI et EcoRI.
- l'ADN complémentaire du facteur IX BamHI de M13TG315 inséré dans le site BglII du polylinker. Il est obtenu en digérant le vecteur M13MP701 (3) par les enzymes

BamHI et EcoRI puis en insérant les séquences EcoRI - PstI de M13MP8 (6), le grand fragment PstI - FnuDII de l'ADN complémentaire du facteur IX (de pTG397 (7)) et un adaptateur FnuDII - BamHI de séquence

5 5' GATCCATGCAGCG 3'

3' GTACGTCGC 5'

restaurant la séquence codante complète de l'ADN complémentaire.

10 Les plasmides pSB394 et pSBDH394 diffèrent en premier lieu par le site d'intégration de l'ADN complémentaire du facteur IX. Si dans pSB394 cet ADN est inséré dans le site BglII du polylinker, dans pSBDH394, c'est dans le site BamHI qu'il est inséré. De plus, en
15 une seconde étape, l'ADN complémentaire de DHFR de souris (fragment HindIII - BglII de pMTVdhfr(8)) est introduit entre les sites HindIII et BglII du polylinker (voir fig. 3).

20 b) Construction des plasmides pTGEIII385, pTGEIIIDH385 et pTGEIIINéo385 contenant un fragment du gène EIII de l'adénovirus 2

Pour réaliser ces constructions, on peut utiliser
25 l'adénovirus 2 déposé sous N° ATCC VR-846. Le plasmide pTGEIII385 (fig. 4) est obtenu par digestion de pSB394 par EcoRI et BamHI puis en substituant le promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 et l'ADNc du Facteur IX par les séquences suivantes :

30

- le fragment EcoRI - SmaI de l'Adénovirus 2 entre les séquences 27372 et 27571 (voir fig. 1) (les coordonnées correspondent à celles obtenues à partir de la séquence Ad2 de la banque de données de l'EMBL) ;

35

- le fragment EcoRV - KpnI de polylinker de M13TG131 (3) ;

- l'activateur du virus SV40 sous forme du fragment
KpnI - HindII de pSO (4) ;
- la séquence de l'Adénovirus 2 des nucléotides 27572 à
28812 (du site SmaI du promoteur de EIII à l'ATG, voir
fig. 1).
- l'ADN complémentaire du facteur IX fusionné à l'ATG
initiateur de EIII.

10

Pour réaliser cette fusion de l'ADN
complémentaire du facteur IX et du gène EIII au niveau
des ATG initiateurs, l'ADN complémentaire du facteur IX
est excisé sous forme du fragment BamHI-XhoII par
digestion partielle de M13TG390 (décrit ci-après) et
cloné dans le site BamHI de M13TG131 donnant le vecteur
M13TG373.

15

M13TG390 dérive de M13TG120 (3) et contient
entre les sites SalI et PstI les séquences suivantes :

20

- un adaptateur SalI - FnuDII de séquence :

5' TCGACCATGCAGCG 3'

25

3' GTACGTCGC 5'

- le fragment FnuDII - PstI de l'ADNc du facteur
IX provenant de pTG397 décrit dans la publication
européenne de brevet EP-167420.

30

Le fragment HindIII du leader du gène EIII (nucléotide
28653 à 28962, voir fig. 1) est inséré dans le site
HindIII de M13TG373 et une mutagenèse par boucle
utilisant un oligonucléotide de séquence

35

5' GGGGCAACATCCAAGATGCAGCGGTGAACATGATC 3' permet

d'obtenir la fusion des ADN complémentaires du facteur IX et du gène EIII au niveau des ATG initiateurs.

Le plasmide pTGEIINéo385 (fig. 4) résulte de l'insertion dans le site BamHI de pTGEIII385 du fragment BamHI de M13TG1823. Ce vecteur dérive de M13MP9 (6) ; il contient dans son site BamHI un fragment du gène néo, obtenu par digestion BamHI-BglII de pSv2-néo(9). Une fois introduit, ce fragment est muté localement avec un oligonucléotide de séquence 5'CATGCGAAAGGATCCTCATCC 3' permettant d'exciser le gène néo sous forme d'un fragment BamHI de M13TG1823.

Le plasmide pTGEIIDH385 (fig. 4) est obtenu par insertion dans les sites HindIII et BglII de pTGEIII385 du fragment de gène DHFR de pMTVdhfr (8).

c) Expression transitoire dans les cellules CHO

Des boîtes de culture (diamètre 5 cm) sont ensemencées avec 300 000 cellules. Au bout de 24 heures l'ADN des vecteurs d'expression du facteur IX (2 µg) et l'ADN d'un vecteur d'expression de la beta-galactosidase, pCH110 (10), (2 µg) sont cotransférés selon la technique classique de coprécipitation au phosphate de calcium (11). Après 24 heures, les cellules sont lavées avec PBS [137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 8 mM Na₂HPO₄ ; 1,5 mM KH₂PO₄ ; pH = 7, -] et du milieu neuf est ajouté. Après un délai de 48 heures les milieux de culture sont prélevés et la quantité de facteur IX produit, F, est dosée au moyen d'un test ELISA commercialisé par Diagnostica-Stago. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis centrifugées. Elles sont reprises dans 0,2 à 1 ml de tampon Z (10) et cassées au moyen d'une courte sonication. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation,

l'activité beta-galactosidase, B, est dosée dans le surnageant suivant une méthode classique (12) et la quantité totale de protéines, P, est déterminée par test Biorad. L'efficacité des constructions est évaluée par le rapport F.P/B.

Les plasmides de la série pSB (pSB394 et pSBDH394) utilisent des promoteurs contenant des séquences du promoteur majeur tardif de l'Adénovirus 2 jointes aux séquences de l'activateur de SV40 alors que les plasmides de la série pTGEIII (pTGEIIIDH385, pTGEIIINéo385 pTGEIII385) conformément à un aspect de la présente invention comportent la séquence leader et une partie du promoteur du gène EIII de l'adénovirus 2 ainsi que en amont du promoteur les séquences activatrices de SV40.

pSB394 et pTGEIII385 sont deux vecteurs monocistroniques alors que pSBDH394, pTGEIIIDH385 et pTGEIIINéo385 sont polycistroniques utilisant comme second gène, l'ADNc du gène DHFR pour les deux premiers et le gène néo pour le dernier.

Les résultats d'expression transitoire du Facteur IX dans les cellules CHO sont exposés dans le tableau I ci-après.

Tableau I : Mesure de l'expression transitoire du Facteur IX dans des cellules CHO transfectées par différents plasmides.

14

	<u>Plasmide</u>	<u>F x P*</u>
		B
	pSB394	2.8
	pSBDH394	7.8
5	pTGEIII385	17.0
	pTGEIIIDH385	105.0
	pTGEIIINéo385	150.0

* B : activité β -galactosidase

10 P : quantité totale de protéines

F : activité du facteur IX mesurée par ELISA

Le tableau I met en évidence les résultats suivants :

- 15 1) Le fait de remplacer dans le plasmide de départ, le promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 par les éléments du gène EIII de l'adénovirus 2, permet d'améliorer d'un coefficient 5 à 12 la quantité de facteur IX produite.
- 20 2) L'adjonction d'une séquence en aval de l'ADNc du facteur IX améliore d'un facteur 5 l'efficacité des constructions (pTGEIII385/pTGEIIIDH385).
- 25 3) L'adjonction de la séquence du gène néo en aval de l'ADNc du facteur IX donne un résultat légèrement meilleur que l'adjonction de la séquence de l'ADNc du gène DHFR (pTGEIIIDH385/pTGEIIINéo385).

30

Exemple 2 : Expression du facteur VIIIAII

L'analogue du facteur VIII désigné par FVIIIAII a été décrit dans la demande française de brevet n° 8711415
 35 déposée au nom de la Demanderesse. Il est caractérisé en

ce qu'il s'agit du composé délété des acides aminés 771 à 1662.

a) Construction de pTG2307

Le plasmide pTG2307 (fig. 5) contient une partie du plasmide p delta favorisant l'intégration du vecteur en un grand nombre de copies dans le génome et une unité de transcription polycistronique (promoteur + leader) EIII - Facteur VIIIAII/XGPRT.

Il est construit de la façon suivante :

Le plasmide pTG2307 dérive de pTG1509 (déposé à la CNCM sous le numéro I-681 le 24 juillet 1987) décrit dans la demande française de brevet déjà citée n° 8711415 digéré par les enzymes de restriction NcoI et AvaI. Le fragment court est éliminé et substitué par le fragment PvuI - AvaI de M13TG347 (décrit ci-après) avec l'aide d'un adaptateur NcoI - PvuI de séquence :

```

5' CCGGCCTAGGCCCGGGCTGCAGAT 3'
3'      GGATCCGGGCCCCGACGTC 5'

```

M13TG347 dérive de M13TG131 (3) par insertion dans les sites EcoRI et KpnI des fragments :

- EcoRI - EcoRV de pTGEIII1385 portant le promoteur EIII suivi de son leader et une partie de l'ADNc du facteur IX.

- SmaI - KpnI de pTG1080 (13) portant l'extrémité 5' de l'ADNc du facteur VIII.

La fusion au niveau des ATG des protéines EIII et du facteur VIII est réalisée par une mutagenèse par délétion

par boucle grâce à un oligonucléotide de séquence
5' CTGGGGGCAACATCCAAGAATGCAAATAGAACTCTCC 3'.

b) Production de facteur VIII Δ II dans des cellules CHO

Le vecteur pTG2307 ainsi obtenu est transféré dans les
cellules CHODXB11 (Dr. L. Chasin Colombia University,
New York, USA) par la technique de coprécipitation au
phosphate de calcium et les cellules transformées sont
sélectionnées selon le procédé décrit dans la référence
(14) mais en omettant l'aminoptérine. Les clones sont
isolés après 1,5 à 2 mois de sélection puis testés pour
leur production de facteur VIII Δ II. Sur 14 clones testés,
7 produisent entre 1 et 6 U de Facteur VIII (activité
coagulante) pour 10^6 cellules et pour 24 h. Ces niveaux
de productions sont 12 fois supérieurs à ceux obtenus en
utilisant le promoteur SV40 de l'Adénovirus 2 de pTG384
(construction pTG1509, décrit dans la demande française
de brevet déjà citée, n° 8711415) (voir tableau II).

Tableau II : Production de facteur VIII Δ II dans les
cellules CHO en fonction du plasmide
utilisé.

Plasmide	Activité coagulante U/ 10^6 cellules x 24h
pTG1509	0.5
pTG2307	6.0

Exemple 3 : Expression du facteur von Willebrand à l'aide du plasmide pTG2330 (fig. 6)

Le plasmide de départ est le plasmide p delta plus précisément le grand fragment de p delta entre les sites EcoRI et Sall. Le promoteur et le leader du gène EIII sont introduits comme fragment EcoRI - HindIII de pTGEIII385 puis un adaptateur HindIII - BamHI provenant de M13TG131 (3) et le bloc du gène Néo fragment BamHI de M13TG1823 (précédemment décrit) lié au fragment BglII - Sall de pTGEIII385. Le plasmide ainsi formé est désigné par pTG2323.

Pour obtenir le bloc DHFR, le plasmide pSBDH394 est digéré par HindIII et PvuII puis le bloc d'expression du facteur IX est substitué par le promoteur précoce de SV40, fragment HindII - HindIII de p delta. Le site HindIII est ensuite éliminé : le plasmide est digéré par HindIII, le site est rempli par l'ADN polymérase (fragment de Klenow) et le plasmide est reliqué.

Le bloc d'expression de DHFR est excisé par digestion Sall - SphI et cloné dans M13TG131 (3) coupé par ces mêmes enzymes donnant M13TG346. Par bloc DHFR, on entend donc une unité de transcription formée d'un bloc d'expression du gène DHFR sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 privé de sa séquence activatrice. Le plasmide pTG2323 est ensuite digéré par EcoRI puis traité à la nucléase S1. Les extrémités sont remplies avec l'ADN polymérase (fragment de Klenow) puis liguées avec le bloc DHFR, fragment SmaI - Sall de M13TG346 (extrémité Sall remplie à la Klenow). La fusion du site Sall rempli avec le Klenow et le site EcoRI traité à la nucléase S1, régénère un site Sall.

Le bloc DHFR est intégré de sorte que les gènes EIII et DHFR sont transcrits dans des directions opposées (pTG2325). Un polylinker de séquence :

5' AGCTTCGCGAATTCTCGAG 3'
3' AGCGCTTAAGAGCTCCTAG 5'

possédant les sites de restriction HindIII, NruI, EcoRI, XhoI et BamHI est introduit entre les sites HindIII et BamHI de pTG2325, donnant pTG2328. Le polylinker permet d'insérer les ADNc à exprimer. Le vecteur d'expression du facteur von Willebrand (vWF) est obtenu en insérant dans le site EcoRI de pTG2328 l'ADNc sous forme de fragment EcoRI, donnant pTG2330.

L'ADNc codant pour vWF complet est préparé à partir d'ARNm extrait de poumon humain, un organe riche en tissu vasculaire et donc en cellules endothéliales qui sont reconnues comme site de synthèse de vWF. L'ADNc est cloné dans un Bactériophage gt₁₀. Les clones obtenus sont criblés en utilisant des souche nucléotidiques (13).

Plusieurs clones ont été obtenus puis assemblés de façon à obtenir un clone d'ADNc codant pour la protéine entière. Le plasmide contenant les séquences assemblées est constitué du vecteur pTZ18R (Pharmacia) contenant dans son site EcoRI l'ADNc du vWF du nucléotide -131 (considérant que l'ATG initiateur est à +1) au nucléotide 8557 (site SstI). Par construction l'ADNc comprend une extrémité polyG à son extrémité 5' et un fragment SstI-EcoRI de M13TG131 (3) à son extrémité 3'.

Le vecteur pTG2330 contient deux unités de transcription : un bloc polycistronique vWF/néo et le bloc DHFR. Il est possible par conséquent de sélectionner

les clones transformés en utilisant l'un des marqueurs
néo ou DHFR, ou les deux simultanément.

Le vecteur pTG2330 a donc été transfecté dans la
5 lignée CHO-DHFR⁻ DG44 (obtenue auprès du Dr. L. Chasin,
Columbia University, New York, USA) en utilisant la
méthode de précipitation au phosphate de calcium. Trois
jours après le transfert les cellules sont trypsinées et
réparties dans un milieu Alpha 1900 (GIBCO) supplémenté
10 avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et avec de
l'antibiotique G418 à une concentration de 400 µg/ml ou
dans un milieu Alpha 2000 supplémenté en SVF avec (à une
concentration de 10 nM ou de 30 nM) ou sans méthotrexate.
Après deux jours de sélection les cellules en G418 sont
15 trypsinées et réparties soit dans un milieu Alpha 1900
supplémenté en SVF et contenant 600 µg/ml de G418, soit
dans un milieu Alpha 2000 (GIBCO) supplémenté avec du SVF
dialysé et contenant 200 ou 400 µg/ml de G418. Les
cellules sont maintenues dans ces milieux pendant deux à
20 trois semaines puis les clones ayant émergés sont testés
pour leur production de vWF au moyen d'un test ELISA
commercialisé par Diagnostic-Stago.

Des clones producteurs peuvent être obtenus dans
25 toutes les conditions de sélection (Tableau I), les plus
producteurs étant isolés en Alpha 2000 supplémenté avec
du méthotrexate.

A ce stade, il peut être intéressant d'améliorer
30 les conditions de transfert dans les cellules de façon à
obtenir des clones capables de résister à des
concentrations plus élevées de méthotrexate ou de pouvoir
dériver à partir des clones déjà isolés des lignées
résistant à des concentrations plus élevées de
35 méthotrexate.

Tableau III Production des clones CHO-DG44 transformés par pTG2330 suivant les conditions de sélection

5	Milieu de sélection	Nombre de clones obtenus ayant une production de vWF (en ng/10 ⁶ cellules/24h) de :				
10		0-10	10-100	100-500	500-1000	1000-3000
	Alpha 2000SVF	26	8	20	1	0
15	Alpha 2000 SVF Méthotrexate 10nM	5	0	3	3	4
20	Alpha 2000 SVF Méthotrexate 30nM	1	0	0	0	2

REFERENCES

- (1) RIGBY, P.W.J. Dans Genetic Engineering Vol. 3, édité par R. WILLIAMSON. Academic Press p88-141.
- 5 (2) ZIFF, F. (1980). Nature 287, 491-499.
- (3) KIENY, M.P., LATHE, R. et LECOCQ, J.P. (1983). Gene 26, 91-99.
- 10 (4) TAHASASHI, K. et al. (1986). Nature 319, 121-126.
- (5) MIYAMOTO, N.G. et al. (1984). Nucl. Acids Res. 12, 8779-8799.
- 15 (6) MESSING, J. et VIEIRA, J. (1982). Gene 19, 269-276.
- (7) JAYE, M. et al. (1983). Nucl. Acids Res. 8, 2325-2335.
- 20 (8) LEE, F. et al. (1981). Nature 294, 228-232.
- (9) SOUTHERN, P.J. et BERG, P. (1982). J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341.
- 25 (10) HALL, C.V. et al. (1983). J. Mol. Appl. Genet. 2, 101-109.
- (11) GRAHAM, F.L. et A.J. VAN DER EB (1973). Virol. 52, 456-467.
- 30 (12) MILLER, J.H. (1972) in Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor.

- (13) PAVIRANI, A. et al. (1987). Biotechnology 5,
389-392.
- 5 (14) MULLIGAN, R.C. et BERG, P. (1981). Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 78, 2072-2076.
- (15) WU Q.Y. et al. (1988) Blood, 71, 1341-1346.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Vecteur d'expression d'une protéine hétérologue dans
les cellules eucaryotes comprenant une séquence d'ADN
codant pour la protéine hétérologue ainsi que les
éléments assurant son expression, caractérisé en ce
que les éléments assurant l'expression de la séquence
10 codant pour la protéine hétérologue comprennent les
éléments essentiels de la séquence leader et/ou de la
séquence du promoteur du gène EIII de l'Adénovirus 2.
- 15 2. Vecteur selon la revendication 1 caractérisé en ce
qu'il comprend tout ou partie de la séquence leader
du gène EIII.
- 20 3. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce
que la partie de la séquence leader du gène EIII est
celle qui comporte l'intron (nucléotide 27981-28360).
- 25 4. Vecteur selon la revendication 3 caractérisé en ce
que la partie de la séquence leader du gène EIII est
celle qui commence à l'intron (nucléotide 27981) et
s'étend jusqu'à l'ATG initiateur de la traduction.
5. Vecteur selon la revendication 1 caractérisé en ce
qu'il comprend tout ou partie du promoteur du gène
EIII.
- 30 6. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 5,
caractérisé en ce que il comporte tout ou partie du
promoteur et la partie de la séquence leader qui
comporte l'intron (nucléotide 27981-28360) de
l'Adénovirus 2.

7. Vecteur selon la revendication 6 caractérisé en ce que il comporte en outre une séquence activatrice de transcription.
- 5 8. Vecteur selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que il comporte des éléments assurant son intégration dans le génome de la cellule hôte, de préférence la séquence d'ADN mitochondrial murin du plasmide de p delta.
- 10 9. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que il comporte une séquence d'ADN supplémentaire en aval de la séquence d'ADN codant pour la protéine hétérologue.
- 15 10. Vecteur selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte un gène de sélection.
- 20 11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce que le gène de sélection se trouve en aval de la séquence d'ADN codant pour la protéine hétérologue.
- 25 12. Vecteur selon la revendication 11 caractérisé en ce que le gène de sélection se trouve sur un bloc d'expression polycistronique, en aval de la séquence d'ADN codant pour la protéine hétérologue.
- 30 13. Vecteur selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce qu'il s'agit du gène Néo.
- 35 14. Vecteur selon l'une des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que il comporte une unité de transcription d'un premier gène de sélection, et un bloc d'expression polycistronique pour la protéine hétérologue comportant un deuxième gène de sélection.

15. Vecteur selon la revendication 14 en ce que le premier gène de sélection est le gène DHFR.
- 5 16. Procédé de préparation de cellules eucaryotes afin d'obtenir des lignées cellulaires produisant une protéine hétérologue caractérisé en ce que on effectue la transformation de ces cellules par un vecteur selon l'une des revendications 1 à 15 et que l'on sélectionne les cellules exprimant ladite
- 10 protéine hétérologue.
17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que la transfection est effectuée par la technique de coprécipitation au phosphate de calcium.
- 15 18. Lignée cellulaire obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 16 ou 17.
- 20 19. Procédé de préparation d'une protéine hétérologue par des lignées cellulaires caractérisé en ce qu'on cultive une lignée cellulaire selon la revendication 18 sur un milieu de culture approprié et en ce qu'on récupère la protéine hétérologue à partir de la culture.
- 25 20. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que la protéine hétérologue est choisie parmi les facteurs de la coagulation sanguine.

Fig. 1

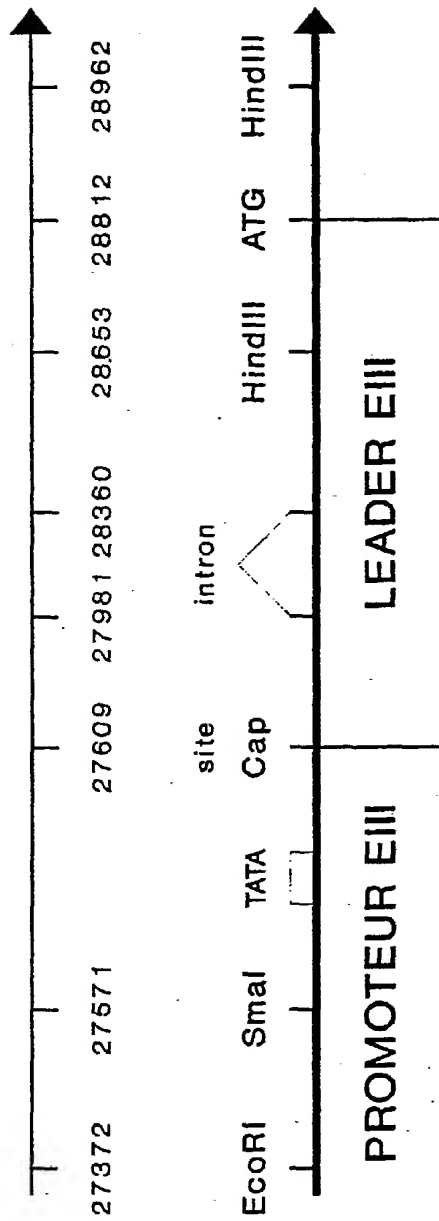


Fig. 2

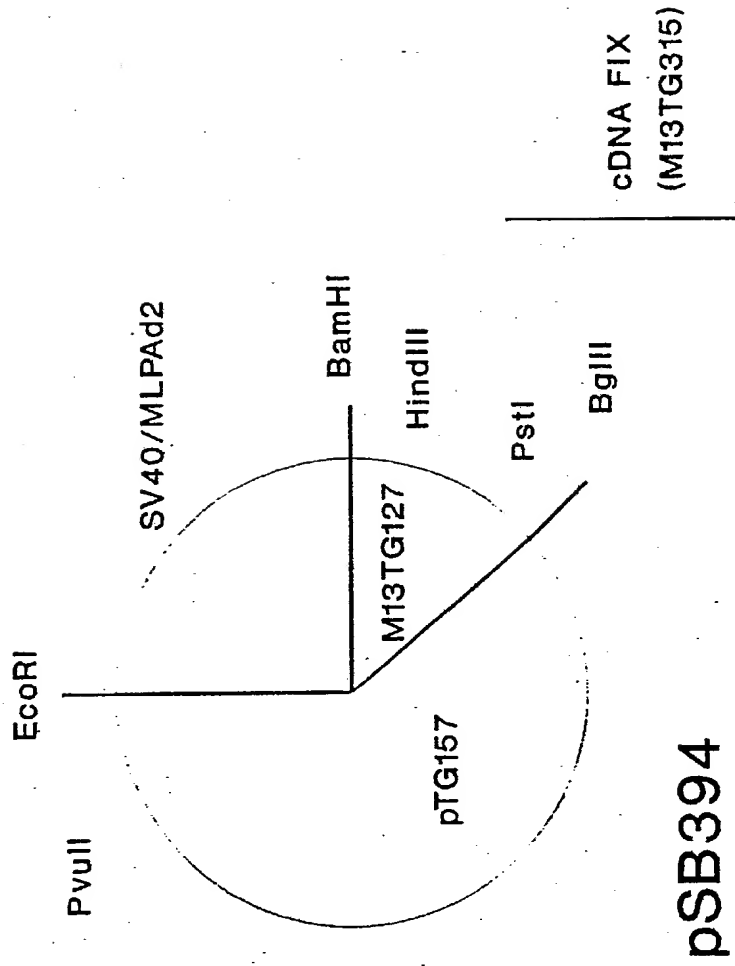
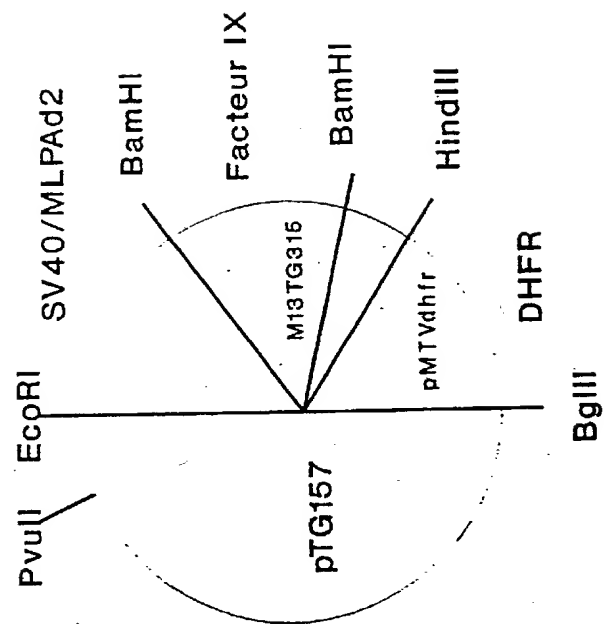


Fig. 3



pSBDH394

Fig. 4

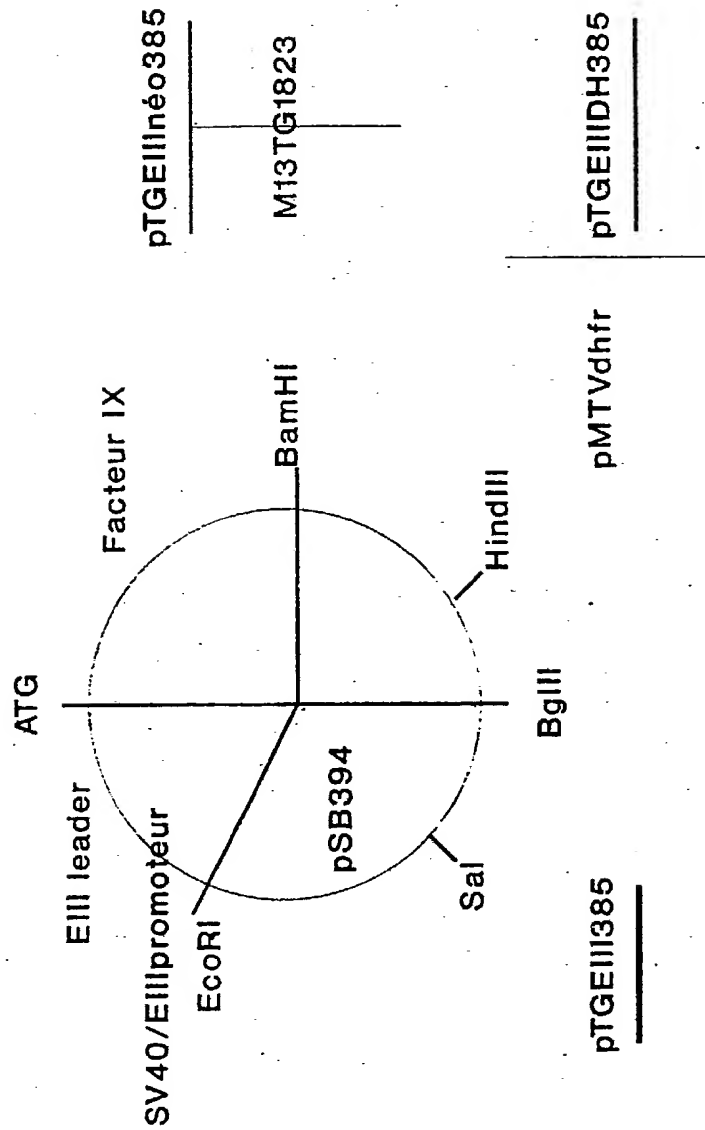
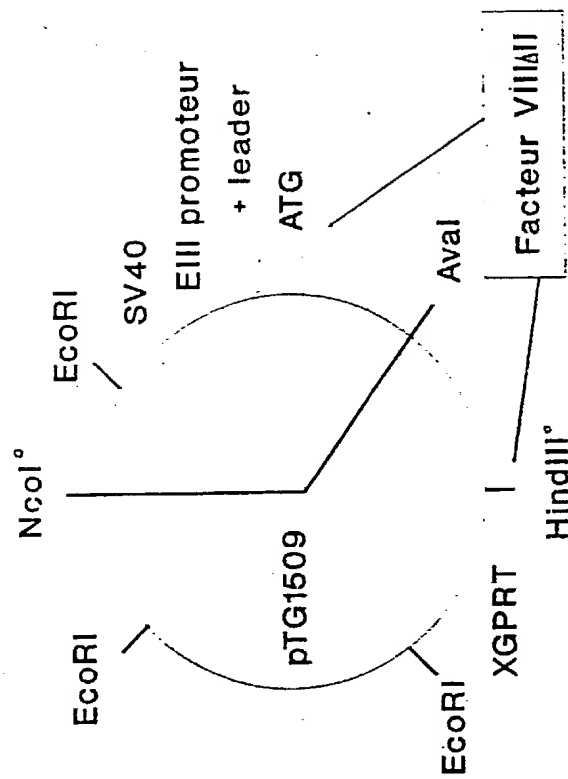
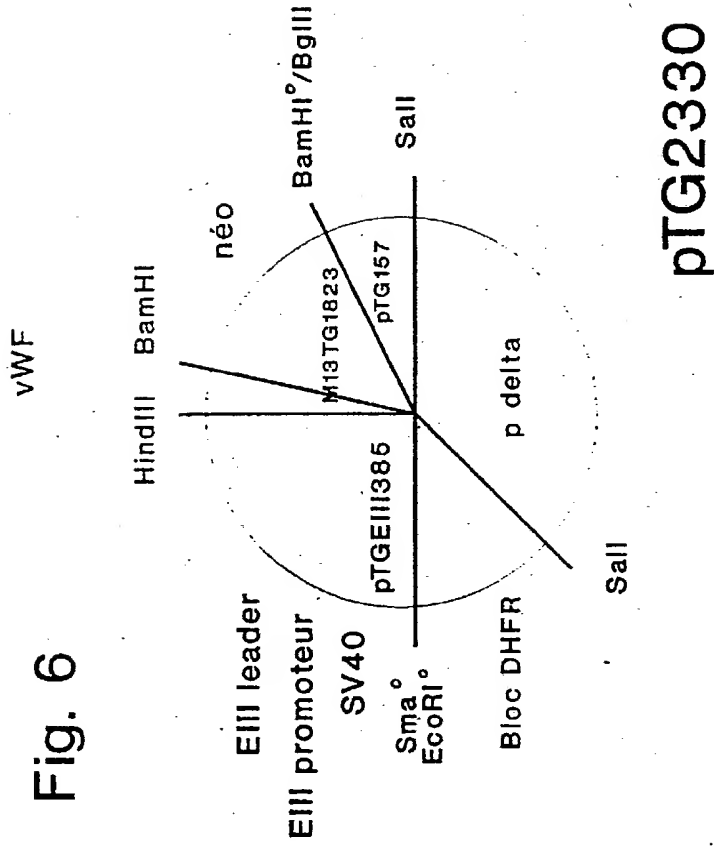


Fig. 5



pTG2307



09/87/212

This invention concerns new expression vectors for the expression of heterologous proteins in eukaryotic cells, particularly in mammalian cells.

An heterologous protein, in the context of the present invention, represents a protein which is not expressed naturally by the cells under study, or alternatively a protein which is not necessary for the survival of these cells.

Numerous vectors designed for the expression of genes coding for such heterologous proteins in mammalian cells have already been described. The need to have vectors that are more and more effective is permanent, specially to increase significantly the quantity of product synthesized by the host system and to allow the selection of producing cells and the preparation of stable cell lines producing the protein of interest in sufficient quantities for industrial production. Various approaches have already been suggested to improve the efficiency of this type of vectors at the level of transcription as well as at the level of translation.

Thus, for example, numerous vectors utilize, as promoters of transcription of the DNA sequence coding for the heterologous protein, hybrid sequences comprising activator sequences of the SV40 virus (repeat of 72 base pairs) associated to the major late promoter of the Adenovirus 2. An improvement of the efficacy of this type of vector has already been obtained by different means, by inserting additional DNA sequences from SV40 (repeats of 21 base

pairs) able to bind transcription factors, or sequence of the tripartite leader of Adenovirus 2 increasing the translation of the messenger RNA.

The present invention aims at providing new vectors useful specially for the expression of complex proteins such as the coagulation factors, in mammalian cells.

The vectors in this invention are characterized by elements allowing the expression of the DNA sequence coding for the heterologous proteins which comprise essential elements of the leader sequence and/or promoter sequence of the EIII gene of Adenovirus 2. By essential elements, we refer to the sequence allowing for the increase of protein production and/or the control of the expression of the promoter sequence.

Adenoviruses possess a double stranded linear DNA which, in the case of serotype 2 (Ad2) comprises 35 kilobases. Adenoviruses have five early transcription units or more, including that of the EIII gene, and many late transcription units (1, 2). The restriction map of the elements upstream of gene EIII is shown in figure 1. The coordinates indicated for the nucleotides correspond to those obtained from the sequence of Ad2 in the EMBL data bank.

Among the important elements of gene EIII, we distinguish between the promoter and the leader sequence with the promoter

extending up to the CAP site, and with the leader sequence extending from the CAP site to the initiator of translation ATG.

Various variations of the invention may be realized.

In a first variation, only all or a portion of the leader sequence of gene EIII is present on the vector. Preferentially, this leader sequence represents a part of the sequence consisting of an intron so that the expression vector carries an intron in the 5' untranslated portion of the messenger RNA (see Fig. 1). In this case, any functional promoter can be used as promoter to express heterologous genes in mammalian cells. Examples of promoters are the one of the cytomegalovirus or the one of the metallothionin gene.

In a second variation, the vector according to the invention comprises all or part of the promoter of the gene EIII which is the 5' portion of the transcription elements extending to the CAP site.

A preferred variation is that in which the vector comprises both the portion of the leader sequence which includes an intron and all or a portion of the promoter of the EIII gene of the Adenovirus 2.

It is obviously preferable to have both the leader sequence and the promoter corresponding to the same gene of Adenovirus 2. It is advantageous, according to an additional characteristic of

the invention, to add a transcription activator, particularly the activator sequences of SV40 (for example the 72 base pair repeats or 21 base pair repeats or a combination of both the 72 base pair and 21 base pair sequences).

The vectors in this invention are generally plasmids but we can also consider viral vectors as long as these viruses have a cycle comprising a step in which the genome is as double stranded DNA, for example papillomaviruses. The vectors are preferentially constructed to insure the integration of the DNA sequence coding for the heterologous protein in the genome of the host strain, so to obtain stable cell lines producing such a protein. To obtain cells with a large number of copies of the gene coding for the heterologous protein, the integration vectors may include a DNA sequence assuring the integration of the plasmid in many hundreds of copies as, for example, the fragment of the mitochondrial DNA of mice present in plasmid p delta.

In some cases, it may be interesting, in order to increase the production of the heterologous protein, that the vector includes an additional DNA sequence downstream of the DNA sequence coding for the heterologous protein. (P.S. I am not sure what this paragraph means).

To select transformed cells, the vector includes preferentially a gene for selection, for example the gene coding

for xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (resistance to mycophenolic acid, XGPRT), the resistance gene for G418 (neo), or the dihydrofolate reductase (DHFR) gene which confers resistance to methotrexate. One will use preferentially the Neo gene.

The selection gene may be carried by an independent transcription unit, or else be placed directly downstream of the DNA sequence coding for the heterologous protein. This second case is particularly advantageous since it allows to obtain a double effect: increase of production and improvement of the efficacy of selection.

It may also be advantageous to place the selection gene in a polycistronic expression unit containing a promoter, a DNA sequence coding for the heterologous protein, a selection gene, an intron, and a polyadenylation site. In fact, it has been demonstrated in many occasions that ribosomes can reinitiate translation downstream of a stop codon, and this property is used to construct plasmids containing a polycistronic selection unit. As selection gene, one can use one of those mentioned above: the murine gene coding for dihydrofolate reductase (DHFR) and the bacterial XGRT gene.

In order to select more easily transformed mammalian cells which express the heterologous protein in large amounts, it is particularly advantageous to add to the polycistronic unit a transcription unit with a selection gene. Preferentially, one

will use an expression unit of the gene DHFR under the control, for example, of an early promoter of SV40 without its activator sequence.

The invention has also for goal to establish a preparation method of eukaryotic cells, to obtain cell lines producing an heterologous protein, in which one transforms these cells with a vector according to the invention and selects the cells expressing the desired proteins.

Among the methods of transformation used, we can mention particularly the technique of coprecipitation with calcium phosphate which will be used in the following examples.

Finally, the invention has a goal to obtain the cell lines by using the procedure according to the invention, particularly the CHO lines producing Factor VIII or Factor IX. Indeed, the invention is applicable to the preparation of blood coagulation factors and thus also involves a procedure for their preparation in which one cultivates the cells on an appropriate culture medium and one recuperates the protein obtained from the culture.

Other characteristics and advantages of the invention will appear during the following detailed description. This description indicates some examples of constructs according to the invention and their application to the expression of complex proteins in

mammalian cells.

The following figures illustrate the invention:

Figure 1 is a schematic diagram of the restriction map of the transcription element upstream of the gene EIII.

Figure 2 is a schematic representation of the structure of plasmid pSB394.

Figure 3 is a schematic representation of the structure of plasmid pSBDH394.

Figure 4 is a schematic representation of the structure of plasmid pTGEIII385, pTGEIIIDH385, pTGEIIIINeo385.

Figure 5 is a schematic representation of the structure of plasmid pTG2307.

Figure 6 is a schematic representation of the structure of plasmid pTG2330.

Example 1 Transient expression of factor 1X in CHO cells.

a) Construction of pSB394 and pSBDH394

Plasmid pSB394 (Fig. 2) is a vector derived from pTG157 described in the European publication of the patent E.P.A. 0140762 in which the sequences EcoRI-BglII, coding for the rabies

glycoprotein, have been eliminated and replaced by the following fragments:

- fragment EcoRI-KpnI of the poly-linker of M13TG131 (3);
- whole activator of the SV40 virus as the KpnI-HindII fragment of pSO (4);
- a portion of the sequence of the late major promoter of Adenovirus 2: SmaI-BamHI of pM4 (5);
- the BamHI-BglII fragment of the poly-linker of M13TG127, a vector comprising the poly-linker sequence

5' AGATCTGCAGGTCCAAGCTTGGACGGATCCCCGGGGAATTC 3'

comprising the restriction sites BglII, PstI, HindIII, BamHI, SmaI and EcoRI;

- the complementary DNA of factor IX (BamHI fragment of M13TG315) inserted into the BglII site of the poly-linker. It is obtained by digesting the vector M13MP701 (3) by the enzymes BamHI and EcoRI followed by the insertion of the sequences EcoRI-PstI of M13MP8 (6); the large PstI-FnuDII fragment of the complementary DNA of factor IX [from pTG397 (7)] and an adaptor FnuDII-BamHI with the sequence

5' GATCCATGCAGCG 3'

3' GTACGTCGC 5'

restoring the complete coding sequence of the

complementary DNA.

Plasmids pSB394 and pSBDH394 firstly differ by the integration site of the complementary DNA of factor IX. In pSB394 this DNA is inserted into the BglIII site of the poly-linker while in pSBDH394, it is inserted into the BamHI site. Moreover, in a second step, the complementary DNA of DHFR from mice [fragment HindIII - BglIII of pMTVdhfr (8)] is introduced between the HindIII and BglIII sites of the poly-linker (see Fig. 3).

b) Construction of plasmids pTGEIII385, pTGEIIDH385 and pTGEIINEo385 containing a fragment of the gene EIII from Adenovirus 2

To make these constructs, one may use adenovirus 2 deposited under ATCC VR-846. The plasmid pTGEIII385 (Fig. 4) is obtained by digestion of pSB394 with EcoRI and BamHI followed by substitution of the late major promoter of adenovirus 2 and the cDNA of Factor IX by the following sequences:

- the EcoRI-SmaI fragment of Adenovirus 2 between the sequence 27372 and 27571 (see Fig. 1) (the coordinates correspond to those obtained from the Ad2 sequence in the EMBL data bank);
- the EcoRV-KpnI fragment of the poly-linker of M13TG131 (3);
- the activator of virus SV40 as a KpnI-HindII

- fragment of pSo (4);
- the nucleotide sequence from 27572 to 28812 (from the SmaI of the promoter of EIII to the ATG, Fig. 1);
- the complementary DNA of factor IX fused to the initiation codon ATG of EIII.

To create this fusion of the complementary DNA of factor IX and of the gene EIII at the initiation codons ATG, the complementary DNA of factor IX is excised as fragment BamHI-XhoII by partial digestion of M13TG390 (described later) and cloned into the BamHI site of M13TG131 to produce the vector M13TG373.

M13TG390 is a derivative of M13TG120 (3) and contains between the site SalI and PstI the following sequences:

- an adaptor SalI- FnuDII with the following sequences:

5' TCGACCATGCAGCG 3'

3' GTACGTGGC 5'

- the fragment FnuDII - PstI of the cDNA of factor IX from pTG397 described in the European publication of the patent EP-167420.

The fragment HindIII of the leader of gene EIII (nucleotide 28653 to 28962, see Fig. 1) is inserted into the HindIII site of M13TG373 and a site-directed mutagenesis using the oligonucleotide

5' GGGGCAACATCCAAGATGCAGCGCGTGAACATGATC 3' allows to obtain the fusion of the complementary DNA of factor IX and of gene EIII at the level of the initiation codons ATG.

Plasmid pTGEIIIINeo385 (fig. 4) results from the insertion of the BamHI fragment of M13TG1823 in the BamHI site of pTGEIII385. This vector is derived from M13MP9(6); it contains in its BamHI site a fragment of the neo gene, obtained by BamHI-BglII digestion of pSv2-neo(9). Once introduced, this fragment is locally mutated using an oligonucleotide with the sequence 5'CATGCGAAAGGATCCTCATTC 3' permitting the excision of the neo gene as a BamHI fragment from M13TG1823.

The plasmid pTGEIIIDH385 (fig. 4) is obtained by the insertion of a fragment of the gene DHFR from pMTVdhfr(8) into the HindIII and BglII sites of pTGEIII385 (8).

c) Transient expression in CHO cells

Tissue culture dishes (5 cm diameter) are seeded with 300,000 cells. After 24 hours, the expression vector (2 µg of DNA) for factor IX and the expression vector pCH110 (2 µg of DNA) for beta-galactosidase (10) were co-transferred according to the classical calcium phosphate method of coprecipitation (11). After 24 hours, the cells were washed with PBS [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH = 7,4] and fresh medium added. After 48

hours, samples of the culture media are taken and the quantity of the factor IX product, F, is measured by an ELISA test commercialized by Diagnostica-Stago. The cells were washed 3 times with PBS and then centrifuged. They were resuspended in 0.2 to 1 ml of buffer Z (10) and broken by short sonication. The cellular debris were eliminated by centrifugation, the beta-galactosidase activity, B, was assayed in the supernatant by a classical method (12) and the total quantity of proteins, P, was determined by the Biorad assay. The efficacy of the construct is evaluated by the ratio F.P/B.

The plasmids of the series pSB (pSB394 and pSBDH394) utilize promoters with sequences of the major late promoter of Adenovirus 2 joined to the sequences of the SV40 activator while plasmids of the series pTGEIII (pTGEIIIDH385, pTGEIIINEo385 pTGEIII385) in conformity with an aspect of the present invention, carry the leader sequence and a part of the promoter of gene EIII of adenovirus 2 as well as, upstream of the promoter, activator sequences of SV40.

pSB394 and pTGEIII385 are two monocistronic vectors while pSBDH394, pTGEIIIDH385 and pTGEIIINEo385 are polycistronic using as second gene the cDNA of gene DHFR for the first two plasmids and the gene neo for the last one.

The results of the transient expression of factor IX in CHO

cells are shown in Table I.

Table I: Measure of the transient expression of Factor IX in CHO cells transfected by different plasmids.

<u>Plasmid</u>	<u>F x P*</u>
	B
pSB394	2.8
pSBDH394	7.8
PTGEIII385	17.0
PTGEIIIDH385	105.0
PTGEIIIINeo385	150.0

*B: B - galactosidase activity

P: quantity of total proteins

F: activity of factor IX measured by ELISA

Table I shows the following results:

- 1) Replacement of the major late promoter of adenovirus by the elements of gene EIII of adenovirus 2 in the initial plasmid allows to improve by a factor of 5 to 12 the quantity of factor IX produced.
- 2) The addition of a sequence downstream of the CDNA of factor IX improves by a factor of 5 the efficacy of the constructs (pTGEIII385/pTGEIIIDH385).

- 3) The addition of the sequence of the neo gene downstream of the CDNA of factor IX gives a result slightly better than the addition of the sequence of the CDNA of the gene DHFR (pTGEI IIDH385/pTGEI INeo385).

Example 2: Expression of factor VIII Δ II

The analog of factor VIII designated by FVIII Δ II was described in the french patient application n° 8711415 deposited in the Demander's name. It is characterized in that it is the product deleted from amino acids 771 to 1662.

a) Construction of pTG2307

Plasmid pTG2307 (fig. 5) contains a part of the plasmid p delta favorizing the integration of the vector in a large number of copies in the genome, and a polycistronic transcription unit (promoter + leader) EIII-Factor VIII Δ II/XGPRT.

It is constructed as follows:

Plasmid pTG2307 is a derivative of pTG1509 (deposited on July 24, 1987 at the CNCM under the number I-681), described in the french patent application no 8711415 already cited, digested by the restriction enzymes NcoI and AvaI. The short fragment is eliminated and substituted by the PvuI-AvaI from M13TG347 (described below) using an NcoI - PvuI adaptor with the sequence:

5' CCGGCCTAGGCCCGGGCTGCAGAT 3'

3' GGATCCGGGCCCCGACGTC 5'

M13TG347 is a derivative of M13TG131 (3) by insertion in the EcoRI and KpnI sites of the fragments:

- EcoRI - EcoRV of pTGEIII385 carrying the EIII promoter followed by its leader and a portion of the cDNA of factor IX.
- SmaI - KpnI of pTG1080 (13) carries the 5' end of the cDNA of factor VIII.

The fusion at the ATG of proteins EIII and of factor VIII is obtained by site-directed mutagenesis to create a deletion by using the oligonucleotide with the sequence

5' CTGGGGGCAACATCCAAGAATGCAAATAGAACTCTCC 3'.

b) Production of factor VIII Δ II in the CHO cells.

The vector pTG2307 thus obtained is transferred into cells CHODXB11 (Dr. L. Chasin Columbia University, New York, USA) by the technique of calcium phosphate precipitation and the transformed cells are selected by the procedure described in reference 14 but omitting the aminopterin. The clones were isolated after 1.5 to 2 months of selection and then tested for their production of factor VIII Δ II. Of 14 clones tested, 7 produced between 1 and 6 U of factor VIII (coagulation activity) per 10^6 cells in 24 h. These levels of production are 12 times higher to those obtained by using the SV40 promoter of Adenovirus 2 of pTG384 (construct pTG1509,

described in the french patent application already cited, n° 8711415) (see table II).

Table II: Production of factor VIII Δ II in CHO cells relatively to the plasmid utilized.

Plasmid	Coagulation activity U/10 ⁶ cells x 24 h
pTG1509	0.5
pTG2307	6.0

Example 3: Expression of the factor van Willebrand using plasmid pTG2330 (fig. 6).

The starting plasmid is plasmid p delta, more precisely, the large fragment of p delta between the EcoRI and SalI sites. The promoter and the leader of gene EIII were introduced as fragment EcoRI-HindIII from pTGEIII 385 followed by an adaptor Hind III-BamHI from M13TG131 (3) and the DNA block made of the fragment BamHI of the Neo gene from M13TG1823 (described previously) linked to the BglII-SalI fragment of pTGEIII385. The resulting plasmid is called pTG2323.

To obtain the DHFR unit, plasmid pSBDH394 is digested with HindIII and PvuII and the expression unit of factor IX is

substituted by the early promoter of SV40, the HindII-Hind III fragment of p delta. The HindIII site is then eliminated: the plasmid is digested by Hind III, the site is filled in by the DNA polymerase (Klenow fragment) and the plasmid is religated.

The expression unit of DHFR is excised by digestion with SalI and SphI and cloned into M13TG131(3) cut by these enzymes to give M13TG346. By DHFR unit, one means a transcription unit made of an expression unit of the gene DHFR under the control of the early promoter of SV40 without its activator sequence. The plasmid pTG2323 is then digested with EcoRI followed by treatment with S1 nuclease. The ends are filled in with DNA polymerase (Klenow's fragment) and ligated with the DHFR unit, the SmaI-SalI fragment of M13TG346 (SalI end filled in with Klenow). The fusion of the SalI site filled in with Klenow and the EcoRI site treated by S1 nuclease regenerates a SalI site.

The DHFR unit is integrated so that the genes EIII and DHFR are transcribed in opposite directions (pTG2325). A polylinker with the sequence:

```
5' AGCTTCGCGAATTCTCGAG      3'
3'   AGCGCTTAAGAGTCCTAG      5'
```

having the restriction sites HindIII, NruI, EcoRI, XhoI and BamHI is introduced between the HindIII and BamHI sites of pTG2325 to produce pTG2328. The polylinker allows to insert the cDNA to be

expressed. The expression vector for von Willebrand factor (vWF) is obtained by inserting the cDNA as an Eco RI fragment into the EcoRI fragment of pTG2328 to produce pTG2330.

The cDNA coding for the complete vWF is prepared from the mRNA extracted from human lung, an organ rich in vascular tissue and thus in endothelial cells which are recognized as the site of synthesis of vWF. The cDNA is cloned into bacteriophage gt 10. The clones obtained are screened using nucleotidic strains (13).

Many clones were obtained and then assembled so to obtain a cDNA clone coding for the whole protein. The plasmid containing the sequences assembled is constituted by vector pTZ18R (Pharmacia) containing in its EcoRI site the cDNA of VWF from nucleotide-131 (with the initiation codon ATG being at +1) to nucleotide 8557 (site SstI). By construction, the cDNA comprises a polyG at the 5' end and a SstI-EcoRI fragment of M13TG131(3) at its 3' end.

The vector pTG2330 contains two transcription units: a polycistronic unit vWF/neo and the DHFR unit. Consequently, it is possible to select transformed clones using one of the neo or DHFR markers, or both simultaneously.

The vector pTG2330 has thus been transfected in the CHO-DHFR-DG44 line (obtained from Dr. L. Chasin, Columbia University, New York, USA) using the method of precipitation with calcium

phosphate. Three days after the transfer, the cells were trypsinized and spread on the medium Alpha 1900 (GIBCO) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) with the G418 antibiotic at a concentration of 400 µg/ml or in an Alpha 2000 medium supplemented with FBS with (at a concentration of 10 nM or 30 nM) or without methotrexate. After two days of selection, cells in G148 are trypsinized and spread either in an Alpha 1900 medium supplemented with FBS and 600 µg/ml of G418, or in an Alpha 2000 medium (GIBCO) supplemented with dialysed FBS and 200 or 400 µg/ml of G418. The cells are maintained in these media for two to three weeks and the clones obtained are tested for their production of vWF using an ELISA test commercialized by Diagnostic-Stago

Producing clones may be obtained in all the selection conditions (Table I), the most productive being isolated in Alpha 2000 medium supplemented with methotrexate.

At this stage, it may be interesting to improve the conditions of transfer into the cells so to obtain clones capable to resist to higher concentrations of methotrexate, or to be able to obtain cell lines resistant to higher concentrations of methotrexate from clones already isolated.